UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1942-1943 - N° 323

RECHERCHES

sur la

précipitation des albumines et des lipides du sérum sanguin

par le Sulfate d'Ammonium en fonction du pH.

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

Mention Pharmacie

présentée et soutenue publiquement le Lundi 7 Juin 1943

PAR

Joseph-Jean-Pierre-Raymond DUBOY

Né à HAGETMAU (Landes), le 12 Avril 1915

Examinateurs de la Thèse

- MACHEBŒUF, Professeur... — *Président*
- CHELLE, Professeur..... — *Juges*
- WANGERMEZ, Professeur... — *Juges*
- CASTAGNOU, Agrégé..... — *Juges*

EDITIONS JEAN-LACOSTE
C. O. L. 31.0731
MONT-DE-MARSAN
1943

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536503_0089

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1942-1943 - N° 323

RECHERCHES

sur la

précipitation des albumines et des lipides du sérum sanguin

par le Sulfate d'Ammonium en fonction du pH.

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

Mention Pharmacie

présentée et soutenue publiquement le Lundi 7 Juin 1943

PAR

Joseph-Jean-Pierre-Raymond DUBOY

Né à HAGETMAU (Landes), le 12 Avril 1915

Examinateurs de la Thèse	MACHEBŒUF, Professeur ..	*Président*
	CHELLE, Professeur	*Juges*
	WANGERMEZ, Professeur ..	
	CASTAGNOU, Agrégé	

ÉDITIONS JEAN-LACOSTE

Mont-de-Marsan

Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux

DOYEN : M. MAURIAC.
ASSESSEUR : M. LABAT.
DOYEN HONORAIRE : M. C. SIGALAS.
PROFESSEURS HONORAIRES :
MM. DENIGES, BEILLE, CHAVANNAZ, C. SIGALAS, DUPOUY,
A. MANDOUL, PETGES, GUYOT, ABADIE, ANDÉRODIAS.

PROFESSEURS :

	MM.		MM.
Clinique médicale	MAURIAC.	Zoologie et parasitologie	R. SIGALAS.
id.	DUPÉRIÉ.	Médecine expérimentale	AUBERTIN.
Clinique chirurg. et gynécol.	JEANNENEY.	Clinique ophtalmologique	BEAUVIEUX.
Clinique chirurgicale	PAPIN.	Clinique chirurg. inf. et orthop.	ROCHER.
Pathologie et thérapeutique géné.	CARLES.	Clin. des maladies infectieuses	DAMADE.
Clinique d'accouchements	RIVIÈRE.	Chimie biologique et médicale	MACHEBŒUF.
Anatomie pathol. et microsc. clin.	N.	Physique méd. et pharmaceutique	WANGERMEZ.
Anatomie	VILLEMIN.	Méd. col. et clin. mal. exotiques	BONNIN.
Anatomie générale et histologie	G. DUBREUIL.	Clin. malad. cutanées et syphilitques	JOULIA.
Hygiène	LEURET.	Clin. des mal. des voies urinaires	DUVERGEY.
Médecine légale et déontologie	LANDE.	Clin. mal. nerveuses et mentales	DELMAS-MARSAL
Electroradiol. et clin. d'él. médic.	RÉCHOU.	Clin. d'oto-rhino-laryngologie	PORTMANN.
Chimie	CHELLE.	Toxicologie et hygiène appliquée	LABAT.
Botanique et matière médicale	GOLSE.	Hydrologie thérap. et climatol.	CREYX.
Pharmacie	VITTE.	Clinique odonto-stomatolopique	DUBECQ.
Physiologie	FABRE.		

MM. LACOSTE (Histologie), PÉRY (Obstétrique), PERRENS (Maladies mentales)
FAUGÈRE (Obstétrique), CHARRIER (Chirurgie générale)

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

	MM.		MM.
Anatomie	DUFOUR.	Chirurgie générale	MAGENDIE.
Physiologie	FRANCK.	—	POUYANNE.
Médecine générale	PIÉCHAUD.	Obstétrique	MAHON.
id.	DE GRAILLY.	Ophtalmologie	N.
id.	FONTAN.	Oto-rhino-laryngologie	DESPONS.
id.	BROUSTET.	Dermatologie et syphiligraphie	N.
id.	DERVILLÉE.	Physique médicale	N.
id.	SARIC.	Chimie gén. pharm. et toxicol.	CASTAGNOU.
id.	DUBARRY.	Histoire natur. pharmaceutique	GIRARD.
Chirurgie générale	LOUBAT.	Pharmacie	MESNARD.
id.	MASSÉ.	id.	GRANGER.
id.	DARGET.	Histoire natur. méd. et parasitol.	R. MANDOUL.

COURS COMPLEMENTAIRES :

	MM.		MM.
Médecine opératoire	LOUBAT.	Ophtalmologie	N.
Accouchements	MAHON	Anatomie	J.BEAUVIEUX.
Puériculture	FAUGÈRE.	Chimie minérale	CASTAGNOU.
Zoologie et parasitologie	R. MANDOUL.	Cryptogamie	GIRARD.
Médecine légale	DERVILLÉE.	Botanique	GIRARD.
Urologie	DARGET.	Pharmacie galénique	MESNARD.
Législation pharmaceutique	POPLAWSKI.	Bactériologie	MOUREAU.
		Physiologie	LIARD.
		Chimie biologique	TAYEAU.

Le Secrétaire de la Faculté : ROUGERIE.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE
ET DE MON BEAU-FRÈRE

A MA MÈRE

A MES SŒURS

A MON FRÈRE

A MA BELLE-SŒUR

A MON BEAU-FRÈRE

A MES CAMARADES DU LABORATOIRE DE CHIMIE BIOLOGIQUE ET MÉDICALE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

A Mademoiselle Marguerite FAURE

Assistante à l'Institut Pasteur de Paris,
Chargée de Recherches au Centre National de la Recherche Scientifique,
Docteur ès-Sciences,

en remerciement des précieux conseils qu'elle nous a si souvent prodigués.

A Monsieur le Docteur Ch. De COQUET

Chef des Travaux pratiques de Chimie biologique à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux,
Officier de l'Instruction publique,

qui a guidé nos premiers pas dans le laboratoire et qui, depuis lors, n'a jamais cessé de nous encourager. Hommage respectueusement reconnaissant.

A Monsieur Francis TAYEAU

Chargé du Cours de Chimie biologique
à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux,
Chargé de Recherches au Centre National
de la Recherche Scientifique,
Docteur ès-Sciences,

notre ami qui, sans jamais compter sa peine, nous a apporté une aide précieuse, particulièrement dans la rédaction de ce travail.

Hommage de profonde reconnaissance et d'amitié.

A mes Maitres

À MES JUGES

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ R. CASTAGNOU

dont nous avons suivi l'enseignement avec tant d'intérêt.

Hommage respectueux.

MONSIEUR LE PROFESSEUR WANGERMEZ

Professeur de Physique médicale et pharmaceutique
à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux,
Electroradiologiste des hôpitaux,
Sous-Directeur du Centre régional de lutte contre le cancer
de Bordeaux et du Sud-Ouest,
Officier d'Académie,

qui a bien voulu nous faire l'honneur de juger notre travail.

Hommage de respectueuse reconnaissance.

MONSIEUR LE PROFESSEUR CHELLE

Professeur de Chimie à la Faculté de Médecine
et de Pharmacie de Bordeaux,
Correspondant de l'Académie de Médecine,
Chevalier de la Légion d'Honneur,
Officier de l'Instruction publique,

qui, au cours de nos études, nous a souvent témoigné sa bienveillante sympathie et qui aujourd'hui nous fait l'honneur de faire partie de notre jury de thèse.

Hommage de respectueuse reconnaissance.

A NOTRE MAITRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR M. MACHEBŒUF

Chef de Service à l'Institut Pasteur de Paris,
Professeur de Chimie biologique et médicale
à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux,
Membre du Comité consultatif d'hygiène,
Docteur ès-Sciences,
Chevalier de la Légion d'Honneur,
Officier d'Académie,

qui, après nous avoir si aimablement accueilli dans son laboratoire, nous a inspiré le sujet de ce travail, dont il a toujours suivi avec bienveillance la réalisation.

A ses côtés, nous avons pu en les appréciant tirer profit de ses immenses connaissances et de son extraordinaire érudition.

Travailler auprès d'un tel Maître a été pour nous un sujet de fierté en même temps qu'un immense plaisir.

Hommage de très respectueuse reconnaissance.

INTRODUCTION

Dans le Laboratoire de notre Maître, le professeur Machebœuf, a été réalisée une série de recherches sur les protéides et les lipides du sérum sanguin. Ces travaux ont déjà conduit à d'intéressantes conclusions et à diverses applications médicales.

Monsieur le professeur Machebœuf a bien voulu nous associer à ces recherches en nous proposant de reprendre avec plus de détails les travaux déjà anciens de ses élèves Sandor, Bonnefoi et Goret sur la précipitation des albumines par les sels neutres en fonction du pH. Notre attention devait être plus particulièrement attirée sur un point laissé jusqu'ici dans l'ombre, à savoir le devenir des lipides sériques au cours de la précipitation des albumines.

Nous tenons à manifester ici notre reconnaissance à M. le professeur Machebœuf qui nous a guidé pas à pas dans ce travail et nous prodigua constamment ses conseils bienveillants.

Nous tenons aussi à remercier M. Tayeau qui nous aida avec une infinie bienveillance non seulement lors de nos recherches bibliographiques, mais encore lors de la rédaction de la présente thèse.

PREMIERE PARTIE

HISTORIQUE

Les protéides du sérum sanguin

Les protéides du sérum sanguin

Le sérum sanguin des divers mammifères contient 80 à 95 grammes de protéides par litre.

Depuis longtemps déjà, de nombreux chercheurs se sont efforcés de fractionner ces protéides. Panum (62) s'est le premier attaqué avec fruit à ce problème.

Cet auteur considère qu'il existe dans le sérum deux grandes fractions :

1° protéides précipitant par dilution du sérum;
2° protéides ne précipitant pas par dilution du sérum.

Peu après, Schmidt (76) propose un nouveau mode de séparation de ces fractions. Il constate qu'en dissolvant dans le sérum du chlorure de sodium jusqu'à saturation, il précipite une fraction à laquelle il donne le nom de « *Globulines* ».

Après les travaux de Weyl (31) (qui fractionne les protéides sériques en utilisant l'anhydride carbonique) et les critiques d'Hammarsten (22) sur les différentes techniques proposées jusqu'alors, Hofmeister et ses élèves (26-27) abordent l'étude systématique du fractionnement des protéides. Ils remarquent que par addition progressive de sulfate d'ammonium à du sérum sanguin, il se forme, dès que la teneur en sel est suffisante, un précipité de protéides qui augmente avec la concentration en sulfate d'ammonium. Lorsque cette concentration correspond environ à la demi-saturation, le précipité n'augmente plus et il faut élever beaucoup la concentration en sel pour qu'une nouvelle fraction apparaisse. Il y a donc au voisinage de la demi-saturation en sulfate d'ammonium un palier séparant deux fractions protéidiques ayant des solubilités et des propriétés différentes, comme l'ont montré Kauder (33) puis Pohl (65). La première de ces fractions fut appelée « globuline », la seconde « albumine ».

La fraction précipitée par le sulfate d'ammonium à demi-saturation et appelée globulines par Hofmeister est-elle identique à la fraction obtenue à l'aide de chlo-

rure de sodium et appelée également globulines par SCHMIDT ?

Au premier abord, on pourrait croire identiques ces deux fractions qui portent le même nom ; il n'en est rien cependant ainsi que l'ont montré divers auteurs (HAMMARSTEN (22), MARCUS EMIL (56), DULIÈRES (11), THIODET, et RIBÈRE (88), MACHEBŒUF, TAYEAU et BATTUT (53). Cette erreur de nomenclature a malheureusement entraîné une grande confusion, le terme « globuline » étant utilisé pour désigner des fractions protéidiques différentes (1).

La technique d'HOFMEISTER prévaut aujourd'hui car les globulines et les albumines séparées selon la technique de cet auteur diffèrent nettement par de nombreuses propriétés.

COMPARAISON ENTRE LES GLOBULINES ET LES ALBUMINES

Si les divers éléments rencontrés dans ces deux fractions protéidiques (HAMMARSTEN (22), PIETTRE (63), ACHART et GRIGAUT (3), METZGER (57), MALERBA (55), SCHULTZ (77), MOERNER (59), FLEITMANN (13), ne peuvent pas les différencier nettement, il n'en est pas de même pour leur teneur en certains aminoacides : ABDERHALDEN et ses élèves (2), en effet, ont constaté des différences appréciables en ce qui concerne la cystine (1,5 p. 100 pour les globulines, 2,3 p. 100 pour les albumines) et la proline (2,8 p. 100 dans les globulines, 1 p. 100 dans les albumines). D'autres auteurs (HAAS et TRAUTMANN (20), KIJOTARI (34), FURTH et FISCHER (17), HERZFELD (25), OKABE (60) ont complété ces résultats par de nouvelles analyses.

Mais ce sont surtout les travaux de SVEDBERG (80-81) qui ont apporté au problème de la différenciation des protéides sériques les plus solides arguments. En utilisant sa technique d'ultracentrifugation, cet auteur a montré que les globulines ont un poids moléculaire de 150.000 environ, tandis que celui des albumines n'est que de 70.000.

Les travaux de TISELIUS (89) ont confirmé ce fait en montrant que les globulines se différencient des albumines par leur vitesse de déplacement sous l'influence

---

(1) Signalons que d'autres méthodes ont été proposées ; contentons-nous de mentionner celle de HOWE (30) qui utilise le sulfate de sodium et celle de JAMESON et ROBERTS (31) qui met en jeu le citrate de potassium.

d'un champ électrique. TISELIUS (89) a même pu montrer que les globulines se séparent par électrophorèse en trois fractions distinctes, a, b et y dont les vitesses sont dissemblables.

Concluons donc qu'il existe dans le sérum sanguin deux grandes fractions protéidiques; les globulines et les albumines différant entre elles par leur solubilité et leurs propriétés physico-chimiques.

LES CENAPSES LIPIDOPROTEIDIQUES

Les fractions protéidiques que l'on peut obtenir en utilisant les techniques précitées ne contiennent pas que des protéides ; elles contiennent aussi des lipides. Le sérum normal de l'homme contient 7 à 9 grammes de lipides par litre et chacune des fractions protéidiques entraîne avec elle une partie de ces lipides, liées aux protéides sous forme de cénapses lipidoprotéidiques (40).

Si l'on désire doser les protéides contenus dans les diverses fractions du sérum, il est indispensable de mettre en œuvre une technique dans laquelle les lipides présents n'apportent pas d'erreur ; il faut donc dégraisser les protéides en les coagulant à l'aide d'alcool bouillant, puis en les épuisant à plusieurs reprises à l'aide d'alcool chaud et d'éther (1).

De nombreux travaux ont été effectués en vue de préciser la nature des liaisons unissant les lipides et les protéides du sérum sanguin (2).

Après les remarques de HOPPE-SEYLER (28), WILLSTATTER et ROHDERVALD (32), BANG (4), DEGKWITZ (7),SOERENSEN (78), etc., MACHEBŒUF et SANDOR (45) ont effectué des recherches mettant en jeu l'action d'éther additionné de faibles quantités d'alcool sur le sérum sanguin. Les résultats qu'ils ont obtenus leur ont permis d'échafauder une hypothèse qui, depuis lors, a reçu d'importantes confirmations (MACHEBŒUF et TAYEAU (46-47-48-49-50-51-52), TAYEAU (82-83-84).

Selon MACHEBŒUF et SANDOR, les lipides et les protéides de certaines cénapses seraient unis entre eux grâce à l'affinité réciproque (force de Van der Vaals) que présentent leurs chaînes polyméthyléniques homologues, tandis que les fonctions hydrophiles des protéides seraient orientées vers l'eau.

---

(1) Voir plus loin, page 20.

(2) Pour plus de détails, voir MACHEBŒUF (40), SANDOR (72), DELAGE (8), TAYEAU (82).

En étudiant l'action des saponosides puis des sels biliaires (86-87) sur le sérum sanguin, Tayeau admet que le cholestérol serait uni aux protéides grâce à la similitude existant entre le noyau du cholestérol et les cycles formés par les aminoacides dans les protéides (1).

Quoi qu'il en soit, retenons que les fractions protéidiques du sérum sanguin ne sont pas constituées par des protéides purs mais par des cénapses lipidoprotéidiques.

FRACTIONNEMENT DES GLOBULINES

La complexité des fractions protéidiques du sérum fit penser à certains auteurs que ces dernières pouvaient être constituées par des protéides différents.

Marcus Emil (56) remarque que, si l'on élimine dans le sérum les globulines précipitant par dilution, on obtient encore un abondant précipité par le sulfate d'ammonium à demi saturation. A la suite de cette observation, Marcus Emil appelle « euglobulines » la fraction insoluble dans l'eau distillée et « pseudo-globulines » la fraction soluble dans ces conditions. Peu après, Quinan (68) remarque d'ailleurs que si l'on porte du sérum à la dialyse contre de l'eau distillée, la fraction protéidique qui s'insolubilise ne représente qu'une faible proportion des globulines.

Porges et Spiro (67), puis Fuld (16) essayent de rendre plus simple l'obtention des euglobulines en déterminant la quantité de sulfate d'ammonium à ajouter au sérum pour ne précipiter que les globulines insolubles dans l'eau. Malgré le manque de netteté des zones critiques, ils décident de considérer comme des euglobulines les protéides précipitant par le sulfate d'ammonium au tiers de saturation et comme des pseudoglobulines les protéides précipitant entre le tiers et la demi-saturation.

D'autres techniques furent encore proposées ; elles ne firent qu'augmenter l'imprécision du terme « euglobulines « qui suivant les auteurs se rapporte à des fractions protéidiques fort différentes (14).

Depuis que l'on a démontré que dans les immunsérums les anticorps sont fixés dans certains cas aux

---

(1) L'existence des groupements polycycliques dans les molécules protéidiques a déjà été soupçonnée ou admise par divers auteurs (Fischer, Adderhalden, Karrer, Troensegaard, Bergmann, Wrinch (66).

euglobulines et dans d'autres cas aux pseudoglobulines, le problème du fractionnement des globulines a acquis une importance nouvelle.

Il résulte des récents travaux effectués à ce sujet que c'est la technique de Marcus Emil qui est le plus couramment adoptée (87 bis).

Euglobulines et pseudoglobulines sont-elles des fractions nettement différenciées ?

A la lumière des travaux de Machebœuf et Tayeau (48), il semble que non. En étudiant l'action des savons en présence d'éther sur les diverses fractions protéidiques du sérum sanguin, ces auteurs sont parvenus à montrer que les euglobulines ne doivent leur insolubilité dans d'eau distillée — propriété qui sert à les définir — qu'aux impuretés et en particulier aux lipides qui leur sont liés. Ce fait avait d'ailleurs été prévu depuis longtemps par Hardy (24), Chick (6), Handowsky et Wagner (23), Jarisch (32), Samuely (71), etc...

FRACTIONNEMENT DES ALBUMINES

Les albumines du sérum sanguin apparurent comme une individualité beaucoup plus nette que les globulines à la suite des travaux de Guerber et Hofmeister (19-27). Ces auteurs réussirent en effet à obtenir à l'état cristallisé les albumines sériques.

Halliburton (21) avait essayé de fractionner les albumines en les soumettant à des températures de coagulation croissantes. D'autres part, Hougardy (29) Oppenheimer (61) puis Doerr et Berger (10) avaient tenté des essais de fractionnement en utilisant le sulfate d'ammonium ; Robertson (70) enfin avait conclu à l'existence de deux fractions, l'une amorphe et l'autre cristallisée.

Toutes ces tentatives de fractionnement furent critiquées les unes après les autres (Freund et Lustig (15), Soerensen (78).

C'est alors qu'en 1928, Machebœuf (37) entreprit une longue série de travaux sur l'existence de cénapses lipidoprotéidiques dans le sérum sanguin. Au cours de ses recherches, cet auteur fut amené à fractionner les albumines du sérum sanguin.

TRAVAUX DE MACHEBŒUF

Gardner et Gainsborough (18) avaient constaté que lorsque l'on précipite les globulines du sérum à l'aide

du sulfate d'ammonium à demi-saturation la majorité des graisses reste en solution. A la suite de cette constatation, Machebœuf entreprit le fractionnement du système constitué par la sérum albumine et par les lipides qui restent avec elle en solution.

Tout d'abord, l'auteur constate que la totalité des albumines et des lipides est précipitée à pH 3,8 en présence d'un excès de sulfate d'ammonium. Le précipité que l'on peut recueillir par centrifugation peut être redissous dans de l'eau très légèrement ammoniacale (pH final 7) — l'entraînement des graisses par les protéides est donc réversible.

Cette constatation faite, Machebœuf acidifie à nouveau la solution à l'aide d'acide sulfurique dilué, afin d'amener le pH aux environs de 3,7. Un précipité apparaît. Il répète cette même opération un certain nombre de fois, en prenant soin de doser dans les eaux mères et dans les précipités, les protéides, le phosphore, le cholestérol et les acides gras.

Au cours des précipitations et des dissolutions successives, la majorité des protéides et une partie des substances lipoïdiques passent dans les eaux mères, dont le titre en sulfate d'ammonium va en diminuant. Malgré cela, une importante quantité d'albumine précipite constamment à pH 3,7 et s'enrichit de plus en plus en lipides. Après un certain nombre de dissolutions et de précipitations (7 environ), la composition du précipité tend vers une limite.

On obtient ainsi un complexe contenant environ 40 p. 100 de substances lipoïdiques. Malgré cette énorme teneur en graisses, la substance a une très grande solubilité dans l'eau.

On aurait pu croire que ce complexe était produit par des changements irréversibles au cours des nombreux fractionnements effectués à pH 3,8 ; mais, à la suite de nouvelles recherches (Machebœuf et Januskiewicz (44) puis Machebœuf et Dizerbo (42) sur des méthodes simples d'obtention de ce complexe appelé par son auteur « cénapses acidoprécipitables », il faut admettre que ces dernières préexistent dans l'albumine du sérum et qu'elles ont été libérées de leurs attaches physiques par le fractionnement.

Ces cénapses acidoprécipitables ne possèdant pas le même point isoionique que l'ensemble des albumines, on aurait pu penser que les protéides qui entrent dans leur constitution étaient différents de ceux que l'on trouve dans le reste des albumines. Il n'en est rien

cependant, ainsi que l'ont prouvé MACHEBŒUF et JANUSKIEWICZ.

Concluons donc que dans les « albumines » du sérum sanguin, il existe une fraction appelée cénapses acido-précipitables et constituée par un agrégat de protéides et de lipides (MACHEBŒUF et VANAUD (54). Cette fraction qui est très soluble dans l'eau, contient près de la moitié de son poids de substances lipoïdiques.

A la suite de cette importante découverte de MACHEBŒUF, le problème du fractionnement des albumines sériques prit un nouvel essor. SANDOR, BONNEFOI et PÉREZ (74), puis SANDOR, BONNEFOI et GORET (75) étudièrent systématiquement la précipitation des albumines depuis pH 7 jusqu'à pH 4 environ. Le but de ces auteurs était de voir si, dans les albumines, il n'existait pas une ou des fractions présentant un minimum de solubilité. La précipitation à pH 3,8, dont nous avons parlé précédemment, ne correspond pas, en effet, à une précipitation isoélectrique, mais à une insolubilisation en milieu acide de sulfates amphotères selon la conception de MICHAELIS (58).

SANDOR et BONNEFOI sont ainsi parvenus à mettre en évidence un maximum de précipitabilité à pH 6,55 et un minimum un peu au-dessus de l'isoélectrique moyen des albumines.

A la suite du travail de ces auteurs, on peut conclure qu'il existe dans les albumines du sérum, une fraction particulière présentant un point isoélectrique de 6,55 environ.

Au cours de cette étude, SANDOR et BONNEFOI n'ont pas étudié les lipides accompagnant les protéides dans leur précipitation ; nous ne savons donc pas si les substances précipitant au niveau du maximum constaté (pH 6,55) sont des protéides sans lipides ou bien si le précipité est constitué par des cénapses lipidoprotéidiques.

De plus, ces auteurs n'ont pas étudié la précipitation des albumines en-dessous de pH 3,5 où peut-être certains maxima sont susceptibles d'exister.

Pensant que l'étude des lipides accompagnant les protéides dans leur précipitation pouvait nous donner des renseignements intéressants et estimant qu'il y avait intérêt à suivre la précipitation des albumines en-dessous de pH 3,5, notre maître, M. le professeur MACHEBŒUF nous proposa d'étudier la précipitation des albumines du sérum et des lipides qui les accompagnent par le sulfate d'ammonium en fonction du pH.

Les résultats que nous avons obtenus au cours de cette étude font l'objet de la présente thèse.

DEUXIEME PARTIE

Techniques utilisées

Techniques utilisées

Etant données les importantes discussions théoriques qui ont été soulevées en ce qui concerne certaines techniques de dosage (dosage des protéides et des lipides en particulier), il ne nous a pas paru superflu d'exposer les méthodes d'analyse utilisées dans notre travail.

1° OBTENTION DES ALBUMINES SERIQUES

A un volume déterminé de sérum de cheval, on ajoute un volume égal d'une solution saturée et neutralisée (à pH 7) de sulfate d'ammonium pur.

Dans ces conditions, les globulines précipitent. On les recueille par centrifugation. Les eaux mères sont mises de côté, elles seront utilisées pour la préparation des albumines. Le précipité de globulines est dissout dans quelques centimètres cubes d'eau distillée. Pour purifier les globulines, on les précipite une seconde fois de leur solution en ajoutant une quantité de solution saturée de sulfate d'ammonium égale au volume d'eau distillée utilisé pour dissoudre les globulines.

Le précipité est recueilli par centrifugation, tandis que les eaux mères sont ajoutées aux précédentes.

Les eaux mères contiennent les albumines. Celles-ci pourraient être recueillies par centrifugation après saturation de leur solution à l'aide de sulfate d'ammonium, mais Machebœuf (37) a démontré que les albbumines précipitent quantitativement en présence d'une quantité bien moindre de sulfate d'ammonium si l'on acidifie la solution jusqu'à pH 3,7. C'est cette dernière technique que nous avons utilisée.

Les eaux mères des albumines sont donc additionnées d'une solution saturée en sulfate d'ammonium (ou de sulfate d'ammonium en poudre) jusqu'à obtention d'un louche persistant, puis d'acide sulfurique normal jusqu'au virage d'un papier au rouge congo (pH 3,8). Les albumines ainsi précipitées sont recueillies par centrifugation.

Il suffit, pour les dissoudre, de les traiter par de l'eau légèrement alcalinisée à l'aide d'ammoniaque, afin que le pH de l'ensemble soit de 7 environ.

2° DOSAGE DES PROTEIDES ET DES LIPIDES

Au cours de notre travail, nous avons étudié les fractions protéidiques précipitées aux différents pH et sur ces fractions qui se présentent sous forme de précipités compacts et amorphes, nous avons effectué des dosages de protéides et de lipides.

Pour cela nous avons employé la technique de Machebœuf, qui est, en somme, une simplification de la méthode de Kumagawa et Suto (35). Cette technique a déjà donné d'excellents résultats ainsi que l'ont montré divers auteurs, Machebœuf (27), Sandor (72), Delage (8), Tayeau (82), Perez (64), Faure (12), Battut (5), Dizerbo (9), Reboul (69), Vanaud (80), etc...,

a) *Protéides :* On met le coagulum protéidique en suspension dans quatre fois environ son volume d'alcool à 95° puis on agite et l'on plonge le tube dans l'eau bouillante où on le maintient dix minutes environ. On laisse refroidir. On centrifuge et tandis que le liquide surnageant (qui contient une partie des lipides) est recueilli par décantation, le coagulum est repris de nouveau par quatre fois son volume d'alcool. On agite et on maintient de nouveau le tube dans l'eau bouillante pendant dix minutes ; après refroidissement, on centrifuge et l'alcool surnageant est ajouté au premier. Le culot protéidique est traité une troisième fois par l'alcool que l'on recuille également.

Le coagulum est alors remis en suspension dans trois à quatre fois son volume d'éther, que l'on tiédit. Après vingt minutes de contact, l'éther est recueilli par décantation après centrifugation, puis on effectue, dans les mêmes conditions, un deuxième traitement à l'éther.

Les solutions éthérées, rassemblées avec les solutions alcooliques serviront pour le dosage des lipides.

Il faut maintenant éliminer du coagulum protéidique les substances hydrosolubles qu'il peut contenir (et en particulier le sulfate d'ammonium). On le met donc en suspension dans de l'eau bouillante. On centrifuge pour éliminer cette eau et on effectue un deuxième lavage dans les mêmes conditions.

Le tube de centrifugeuse avec son contenu est enfin placé dans une étuve à 105-110° pendant 24 heures,

puis dans un dessiccateur à vide contenant de l'acide sulfurique ou de l'anhydride phosphorique, où on le laisse jusqu'à ce que son poids reste constant.

Le tube de centrifugeuse ayant été préalablement taré vide, on peut déduire de la pesée finale la quantité de protéides contenue dans la fraction précipitée.

b) *Lipides :* L'ensemble des solutions éthérées et alcooliques est placé dans un ballon adapté par un rodage à un réfrigérant descendant relié à un second ballon muni d'une tubulure latérale que l'on met en communication avec une trompe à vide. On chauffe en plaçant le ballon dans l'eau chauffée par une résistance électrique, et l'on poursuit ainsi la distillation de l'éther puis de l'alcool.

Le résidu est alors repris par quelques centimètres cubes de chloroforme, qui ne dissout que les lipides. La solution filtrée est placée dans une fiole de Fourneau préalablement tarée. Après évaporation du chloroforme sous un courant d'azote (afin d'éviter l'oxydation des acides gras), la fiole avec son contenu est placée dans un dessiccateur à vide jusqu'à poids constant.

On déduit ainsi le poids des substances lipoidiques fixées sur les protéides de la fraction étudiée.

3° DOSAGE DU PHOSPHORE LIPIDIQUE

Nous avons effectué, dans nos essais, le microdosage du phosphore suivant la technique de Machebœuf (39).

a) *destruction :* une partie de l'extrait lipidique précédemment obtenu est placée dans un petit matras de Kjeldahl avec 1 cm3 d'acide sulfurique pur et 2 cm3 d'acide nitrique pur.

On porte à l'ébullition ; si la liqueur reste fortement colorée, après la disparition des vapeurs nitreuses, on ajoute de nouveau 0,5 ou 1 cm3 d'acide nitrique et l'on poursuit la destruction jusqu'à obtention d'une solution parfaitement décolorée.

b) *dosage :* au cours de la destruction, le phosphore lipidique a été quantitativement transformé en acide phosphorique.

Après refroidissement, on ajoute 6 cm3 d'eau et 2 cm3 d'une solution saturée de nitrate d'ammonium, puis on porte au bain-marie pendant quinze minutes. A ce moment on ajoute 6 cm3 d'une solution de molybdate d'ammonium à 5 % et on laisse encore dix minutes au bain-marie. Après refroidissement, on ajoute 5 cm3 d'al-

cool à 95°. Il s'est formé un précipité de phosphomolybdate d'ammonium qui se rassemble au fond du matras. On filtre sur un filtre d'Iéna G4 monté sur fiole à vide. On rince avec de l'alcool à 50° jusqu'à ce que les alcools de lavage ne rougissent plus un papier bleu de tournesol. La fiole à vide est alors bien rincée.

Le précipité resté dans le matras et celui retenu sur le filtre sont dissous dans 1 à 2 cm3 d'ammoniaque au quart. On rince à plusieurs reprises le matras et le filtre jusqu'à ce que tout le précipité soit dissous.

Le contenu de la fiole à vide est alors placé dans un grand matras de Kjeldahl et additionné de 10 cm3 de solution de soude N/20 et de 11 gouttes de solution alcoolique de phtaléine du phénol à 0,5 %. L'ensemble est porté à l'ébullition jusqu'à ce que l'ammoniac soit entièrement chassé.

Il s'est formé du phosphomolybdate de sodium et on dose l'excès de soude. Pour cela, on ajoute 10 cm3 d'une solution d'acide sulfurique N/20 ; on porte à ébullition et l'on titre à la soude N/20 en prenant bien soin de ne pas laisser refoidir.

Le nombre de centimètres cubes de soude utilisée multiplié par 0,056 donne le poids du phosphore (en mg) de la prise d'essai.

4° DOSAGE DU CHOLESTEROL

Une partie aliquote de l'extrait lipidique est soumise à la saponification, afin de libérer le cholestérol de ses esters.

Pour cela, l'extrait est additionné de 3 ou 4 cm3 de potasse alcoolique à 5 p. 100 et porté deux heures au microréfrigérant ascendant. La solution alcoolique alcaline est alors additionnée d'éther de pétrole, soluble dans l'alcool. On obtient ainsi une phase unique limpide. On ajoute un volume d'eau égal à la moitié du volume de l'alcool présent dans le mélange. Il se forme ainsi deux phases distinctes : l'une alcooloaqueuse inférieure, qui contient les acides gras à l'état de savons de potassium, le glycérol, etc., l'autre éthéropétrolique supérieure qui contient le cholestérol et l'insaponifiable X.

Le résidu d'évaporation de la phase éthéropétrolique constitue l'insaponifiable total. C'est sur ce résidu que l'on effectue le dosage colorimétrique du cholestérol par rapport à un témoin, grâce à la réaction de Liebermann (36). Cette technique est entachée de quelques

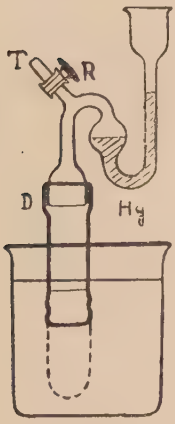
légères erreurs (41) mais sa précision est suffisante pour le but que nous poursuivons.

5° PREPARATION DES DIALYSEURS

Soit pour débarrasser les protéides des sels qui les souillent, soit pour déterminer des points isoioniques nous avons utilisé des dialyseurs que nous avons préparés ainsi :

un tube à essai perforé à son fond d'un petit orifice de 1mm de diamètre (afin de permettre le démoulage) sert de moule. Ce petit orifice est tout d'abord obturé au moyen d'une goutte de collodion qu'on laisse sécher complètement. Le moule est ensuite plongé (plus ou moins profondément suivant la hauteur désirée) dans du collodion à 5 p. 100. Le moule est aussitôt sorti du liquide puis placé horizontalement pendant qu'on lui imprime un mouvement de rotation continue autour de son axe. On arrive ainsi à obtenir autour du moule une couche uniforme de collodion. La rotation du tube est continuée jusqu'à ce que le collodion ait complètement perdu son éther par évaporation.

L'ensemble est ensuite porté dans de l'eau distillée. L'alcool qui imbibait encore le collodion diffuse dans l'eau, la nitrocellulose forme ainsi une membrane transparente solide ayant la forme d'un sac. On empaume le sac avec la main et on lui imprime un mouvement de rotation long autour de son moule. Le sac se libère ainsi assez facilement de son moule. On le place immédiatement dans de l'eau distillée.



Ce sac est ensuite monté sur un tube de verre de même diamètre sur lequel on le fixe solidement au moyen d'un fil de lin. La ligature effectuée, on deshydrate à l'aide d'alcool la partie du sac adhérente au tube puis on place sur la ligature et le tube-support une couche de collodion, qui une fois sec, rendra la ligature hermétique. Pendant la dessiccation de la jointure, il faut éviter la dessiccation de la partie dialysante du sac en remplissant celui-ci d'eau jusqu'à 1 cm de la ligature.

Lorsque l'on veut effectuer une dialyse sous pression, on utilise un tube-support muni à sa partie supérieure d'un rodage D sur lequel peut se fixer un tube recourbé

contenant du mercure. Ce tube est muni d'un conduit latéral T portant un robinet R. Ce dernier étant ouvert, on peut en soufflant par le tube T établir une pression hydrostatique sur le liquide dialysé, pression qui sera maintenue par la fermeture du robinet R. Ce dispositif permet d'établir une pression d'une dizaine de centimètres de mercure à l'intérieur du dialyseur.

Nos dialyses ont toujours été effectuées à la glacière sous toluène, afin d'éviter les risques d'infection. (SOERENSEN).

6° DETERMINATION DES POINTS ISOIONIQUES

On sait que, selon SOERENSEN (73), le point isoionique d'un ampholyte est un point particulier de l'échelle des pH pour lequel cet ampholyte n'émet et n'absorbe pas d'ions H+ (1).

Le pH d'une solution aqueuse d'un protéide rigoureusement pur devrait pratiquement coïncider avec son point isoionique. En effet, la différence entre le point isoionique et le pH de la solution protéidique pure est égale au changement de pH que peut provoquer dans le volume d'eau qui dissout le protéide la quantité d'acide ou de base nécessaire pour amener cette eau au pH du point isoionique du protéide. Or, pour une concentration suffisante du protéide, cette quantité est infime et pratiquement, le point isoionique et le pH de la solution protéidique pure coïncident (SANDOR) (73).

La détermination du point isoionique d'un protéide est donc simple à condition d'obtenir ce protéide à l'état pur.

Pour obtenir ce résultat, on peut porter le protéide à la dialyse contre de l'eau distillée fréquemment renouvelée, jusqu'à ce que l'eau de dialyse ne contienne plus trace d'ions minéraux.

Il suffit ensuite de mesurer le pH de la solution du protéide ainsi traité, pour connaître la valeur de son point isoionique.

7° MESURE DES pH ET COURBES DE TITRATION

Nos mesures de pH ont été faites potentiométriquement soit par la méthode classique d'opposition avec

---

(1) Nous empruntons à PEREZ (64) ces quelques notions résumées sur le point isoinique.

une électrode à hydrogène et un demi élément au calomel (1) soit à l'aide de l'électrode de verre (2).

L'établissement des courbes de titrage, c'est-à-dire la détermination des pH que prend une solution suivant les plus ou moins grandes quantités d'acide ou de soude titrés qu'on lui ajoute, a été fait de la façon suivante :

à une partie aliquote de la solution étudiée, on ajoute des quantités croissantes d'acide ou de soude ; on complète à un même volume et on mesure le pH de la solution, après chaque addition de liqueur titrée. Après avoir déterminé un certain nombre de points, on trace la courbe représentative des variations du pH de la solution protéidique étudiée en fonction de la quantité de solution titrée d'acide ou de soude ajoutée.

Pour chacune de nos expériences, nous avons tracé une telle courbe. En voici un exemple.

Nous partons d'échantillons de 25 cm3 de solution d'albumines de cheval, correspondant à 11,65 cm3 de sérum et préalablement additionnée de 8,115 g. de sulfate d'ammonium.

A chacun des échantillons, nous ajoutons des quantités variables d'acide sulfurique N/2 et partout nous complétons avec de l'eau distillée jusqu'à un volume de 31,5 cm3.

Nous mesurons le pH de chacun de ces échantillons. Voici nos résultats (tableau 1).

TABLEAU 1

QUANTITÉ d'acide sulfurique N/2 ajoutée à 25 cm3 de solution	MILLIVOLTS (à 18°)	pH correspondant
0,54	627	6,51
0,80	611	6,23
1,06	568	5,51
1,50	499	4,32
3,10	418	2,93
4,70	388	2,41
6,50	378	2,23

Ces résulats nous permettent de tracer la courbe de la figure N° 1

(1) Potentiomètre CHAUVIN-ARNOUD.

(2) Electrode de MORTON - Potentiomètre de CAMDRIDGE. Nous remercions particulièrement M. GUILLEMET, directeur du laboratoire de recherches du ravitaillement, qui a bien voulu mettre à notre disposition son appareil à pH.

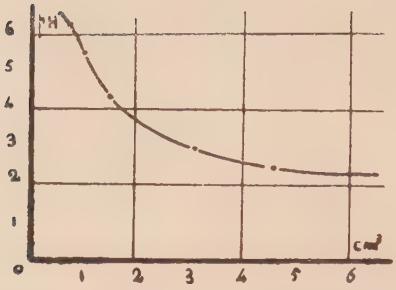


Fig. 1. — Courbe représentative des variations du pH en fonction du volume (en cm3) d'acide sulfurique N/2 ajouté à la solution.

Cette courbe nous permet de savoir avec précision quelle quantité d'acide ou d'alcali il faut ajouter à un volume connu de la solution protéidique pour obtenir un pH déterminé.

Pour chacun de nos essais, nous avons tracé une telle courbe.

TROISIEME PARTIE

Recherches expérimentales

Recherches expérimentales

Nous avons vu, dans la partie historique de notre travail que Sandor, Bonnefoi et Pérez (74), puis Sandor, Bonnefoi et Goret (75) avaient étudié la précipitation des albumines du sérum sanguin par les sels neutres en fonction du pH.

A la suite de leurs recherches, ces auteurs avaient conclu qu'il existait dans les albumines du sérum une fraction protéidique particulière de pH isoélectrique 6,55 et présentant à ce pH un minimum de solubilité.

Au cours de leurs recherches, ces auteurs n'ont pas analysé les lipides liés aux albumines et qui précipitent avec eux. De plus, ils n'ont pas étudié la précipitation des protéides au-dessous de pH 4.

Pensant que les albumines pouvaient contenir d'autres fractions protéidiques, nous avons repris l'étude de la précipitation des albumines par le sulfate d'ammonium en fonction du PH.

ESSAIS N° 1

Dans une première série d'expériences, nous avons étudié la précipitation des albumines à des pH assez espacés, mais échelonnés sur toute la gamme des pH, afin d'étudier l'allure générale du phénomène, nous réservant le soin de préciser par la suite la précipitation des albumines dans les zônes de pH, qui nous paraîtraient les plus intéressantes. Voici l'exposé de l'un de ces essais.

90 cm3 de sérum de cheval sont additionnés d'un égal volume de solution saturée de sulfate d'ammonium neutralisé à pH 7. Les globulines qui précipitent sont recueillies par centrifugation. Les eaux mères contenant les albumines sont mises de côté.

Le précipité globulinique est redissous dans 27 cm3 d'eau distillée et la solution obtenue est additionnée de 24 cm3 de solution saturée de sulfate d'ammonium. Les globulines qui précipitent de nouveau sont recueillies par centrifugation et éliminées, tandis que les eaux

mères sont ajoutées aux précédentes. Ces eaux mères, contenant les albumines mesurent un volume de 186 cm3.

Cette solution est maintenant additionnée de sulfate d'ammonium en poudre jusqu'à ce qu'apparaisse un louche appréciable (14 gr. de sel). Elle mesure à ce moment un volume de 193 cm3 (solution A).

Dans 7 tubes à centrifuger préalablement tarés, on place (1), en agitant :

Tube N° 1.	— 25 cm3 sol. A	+ 0,54 cm3 S 04 H2 N/2	+ 5,36 cm3 eau distillée
2.	— 25	+ 0,80	+ 5,70
3.	— 25	+ 1,06	+ 5,44
4.	— 25	+ 1,50	+ 5,00
5.	— 25	+ 3,10	+ 3,40
6.	— 25	+ 4,70	+ 1,80
7.	— 25	+ 6,50	+ 0

(partout le volume total est de 31,50 cm3)

Les eaux mères sont éliminées et sur les culots de centrifugation, nous effectuons des dosages de lipides de protéides, de phosphore lipidique et de cholestérol suivant les techniques indiquées précédemment. Les résultats que nous avons obtenus sont consignés dans le tableau n° 2.

TABLEAU 2

N° des tubes	Millivolts (19°)	pH	Protéides (mg)	Substances lipoidiques (mg)	Cholestérol total (mg)	Phosphore lipidique (mg)
1	627	6,51	traces	traces	traces	traces
2	611	6,23	90,8	1,8	traces	traces
3	568	5,51	294,8	3,3	0,28	traces
4	499	4,32	415,7	21,7	3,36	0,42
5	418	2,93	581,5	29,1	5,10	0,55
6	388	2,41	515,8	30,0	5,12	0,48
7	378	2,23	575,5	30,0	4,56	—

Ils nous permettent de tracer les courbes représentatives des variations des poids de protéides (Fig. 2) de lipides (Fig. 3) et de cholestérol (Fig. 4) précipités par le sulfate d'ammonium en fonction du pH.

(1) En partant d'une solution identique, nous avons préalablement déterminé les pH des mélanges effectués ci-dessus (voir technique ci-dessous, p. 25).

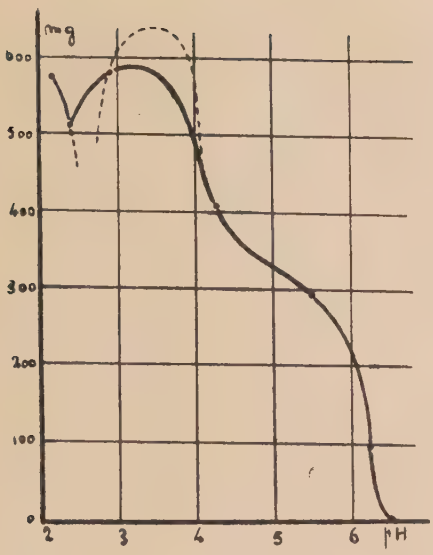


Fig. 2. — Courbe représentative des variations du poids (mg) de protéides précipités par le sulfate d'ammonium en fonction du pH.

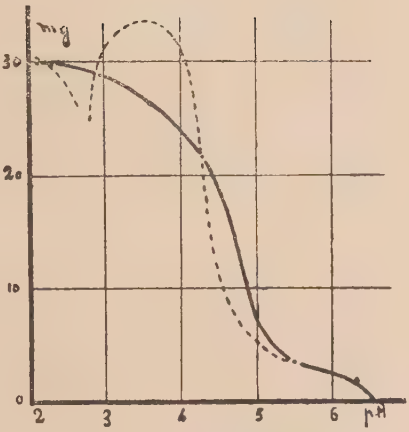


Fig. 3. — Courbe représentative des variations du poids (mg) de lipides précipités par le sulfate d'ammonium en fonction du pH.

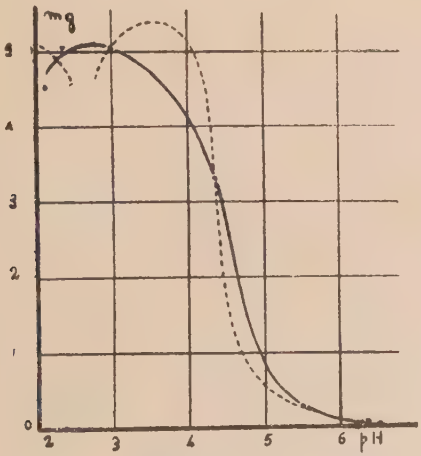


Fig. 4. — Courbe représentative des variations du poids (mg) de cholestérol précipité par le sulfate d'ammonium en fonction du pH.

L'examen des courbes montre tout d'abord qu'il existe un optimum de pH pour lequel la précipitation des protéides albuminiques et des lipides qui les accompagnent

est au maximum. Ce pH est situé aux environs de 3-4. Au premier abord, ceci peut paraître étonnant, car on sait que le plus souvent c'est à leur point isoélectrique que les protéides présentent leur minimum de solubilité (58), or le point isoélectrique des albumines est nettement au-dessus de cette valeur de pH.

Ceci s'explique par le fait qu'ici nous n'avons pas à faire à des protéides purs, mais à des cénapses lipido-protéidiques ; de plus, il est bien connu que la présence de quantités d'électrolytes relativement très faibles suffisent à déplacer le minimum de solubilité vers la région acide.

L'examen des courbes (fig. 2 et 3 principalement), nous permet en outre de remarquer l'existence d'un point d'inflexion situé entre pH 4,2 et pH 5. L'existence d'un tel point peut nous laisser supposer que la courbe que nous avons obtenue pourraît être la résultante de deux autres courbes correspondant à deux fractions ayant leur minimum de solubilité à des pH différents.

A la suite de cette remarque, nous avons décidé d'effectuer une nouvelle série d'expériences dans laquelle nous nous efforcerions d'étudier la précipitation des albumines par le sulfate d'ammonium en fonction du pH, mais en déterminant un plus grand nombre de valeurs de pH.

ESSAIS N° 2

Nous avons opéré comme précédemment, mais en partant cette fois d'une plus grande quantité de sérum.

A partir de 150 cm3 de sérum, nous avons préparé une solution d'albumines mesurant un volume de 315 cm3. Cette solution a été additionnée de sulfate d'ammonium pulvérisé jusqu'à apparition d'un louche appréciable (23 gr.). A ce moment le volume de l'ensemble est de 325 cm3 (liquide A).

Dans douze tubes à centrifuger préalablement tarés, on place, en agitant :

N°s 1.—	25 cm3 liquide A	+ 0,80 cm3 S O4 H2 N/2	+ 3,70 cm3 eau distillée	
2.—	25	+ 0,90	+ 3,60	
3.—	25	+ 1,00	+ 3,50	
4.—	25	+ 1,30	+ 3,20	
5.—	25	+ 1,45	+ 3,05	
6.—	25	+ 1,60	+ 2,30	
7.—	25	+ 1,85	+ 2,65	
8.—	25	+ 2,00	+ 2,50	
9.—	25	+ 2,20	+ 2,30	(partout le
10.—	25	+ 2,60	+ 1,90	volume total
11.—	25	+ 3,10	+ 1,40	est de
12.—	25	+ 4,50	+ 0	29,5 cm3)

Ces mélanges sont soumis à la centrifugation et tandis que les eaux mères servent à vérifier l'exactitude des pH déterminés dans un essai préalable, les précipités sont traités comme précédemment, afin d'y doser les protéides, les lipides, le phosphore lipidique et le cholestérol total.

Les résultats que nous avons obtenus dans cette expérience sont rassemblés dans le tableau n° 3.

TABLEAU 3

N° des tubes	Millivolts (17°5)	pH	Protéides (mg)	Lipides (mg)	Cholestérol total (mg)	phosphore lipidique (mg)
1	643,5	6,82	56,3	1,6	0,07	—
2	635,0	6,70	77,7	1,3	0,08	—
3	630,0	6,59	97,3	1,6	0,08	—
4	602,3	6,10	206,3	2,7	0,17	—
5	581,0	5,73	250,5	4,7	0,56	—
6	543,5	5,08	323,2	10,8	1,71	0,159
7	501,5	4,36	424,7	20,1	5,90	0,347
8	485,8	4,09	403,0	21,8	6,80	0,370
9	469,2	3,80	430,3	22,9	6,86	—
10	444,8	3,38	435,3	21,3	6,06	0,354
11	424,0	3,01	455,6	23,0	6,73	0,408
12	398,0	2,56	486,0	23,6	6,95	0,432

Ils nous permettent de tracer les courbes représentatives des variations des poids de protéides (fig. 5) de lipides (fig. 6), de cholestérol (fig. 7) et de phosphore lipidique (fig. 8) précipités par le sulfate d'ammonium en fonction du pH.

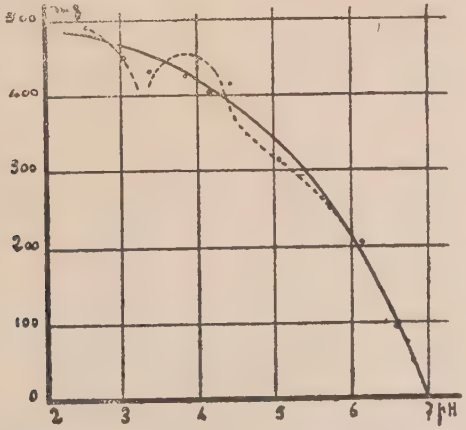


Fig. 5. — Courbe représentative des variations du poids de protéides précipités par le sulfate d'ammonium en fonction du pH.

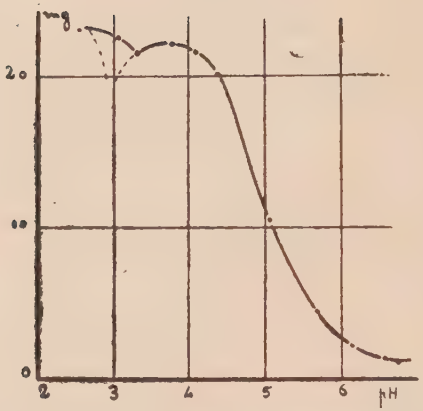


Fig. 6. — Courbe représentative des variations du poids de lipides précipités par le sulfate d'ammonium en fonction du pH.

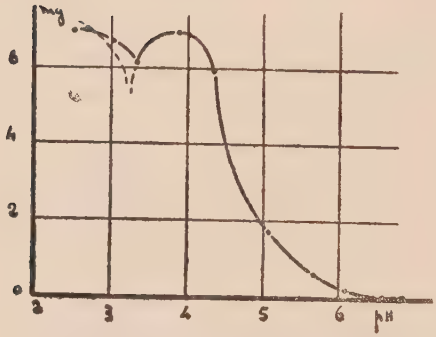


Fig. 7. — Courbe représentative des variations du poids de cholestérol précipité par le sulfate d'ammonium en fonction du pH.

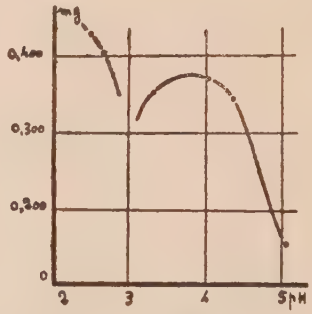


Fig. 8. — Courbe représentative des variations du poids de phosphore lipidique précipité par le sulfate d'ammonium en fonction du pH.

Lorsque nous examinons les figures ci-dessus, nous sommes frappés de constater l'allure générale des courbes des figures 6, 7 et 8. Ces courbes représentent, en effet, un maximum net pour un pH voisin de 3,8.

Comment se fait-il donc que la courbe figure 5 (représentative des variations du poids de protéides précipités par le sulfate d'ammonium en fonction du pH) ne présente pas, elle aussi, ce maximum caractéristique (on constate seulement des irrégularités dans la région

correspondante), que nous avions déjà observé dans l'expérience précédente (voir courbe de la figure 2).

A la suite de quelques essais, qui seront décrits plus loin, nous pensons pouvoir répondre que cela est dû à la différence de temps de contact entre les réactifs pour les divers mélanges. Il s'écoule en effet, un temps appréciable entre la préparation du mélange n° 1 et celle du mélange n° 12. Or, l'influence de ce facteur est loin d'être négligeable ainsi que nous le démontrerons plus loin (page 40).

Quoi qu'il en soit, l'examen des courbes nous permet de constater en outre qu'à pH 5,2 près des 3/4 des protéides sont précipités, alors que les 2/3 des lipides et le 1/5 seulement du cholestérol sont précipités à ce pH.

De plus, remarquons que l'optimum de précipitation est le même pour le cholestérol et pour les lipides totaux (3,8 environ). Le phosphore lipidique ne semble pas suivre exactement la précipitation du cholestérol, ainsi que le montre le tableau n° 4 qui indique pour les différents échantillons le rapport $\frac{\text{P lipidique}}{\text{cholestérol}}$.

TABLEAU 4

	TUBES											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
$\frac{\text{P lipidique}}{\text{cholestérol}}$	—	—	—	—	—	0,11	0,06	0,054	—	0,058	0,061	0,063

Cela nous permet de conclure que non seulement la précipitation des phosphatides débute plus précocement que celle du cholestérol, mais encore qu'il est fort probable que la totalité du cholestérol et de la lécithine n'est pas engagée à la fois dans une seule et même cénapse. Une partie au moins de la lécithine est libre de liaison avec le cholestérol.

Le cholestérol et les phosphatides sont-ils les seules substances lipoidiques qui accompagent les protéides dans leur précipitation ? Nous avons cherché à le savoir.

Pour cela, nous avons déterminé le poids de phosphatides contenu dans nos extraits lipidiques en multipliant par 26 le poids de phosphore lipoïdique trouvé. Nous avons déterminé ensuite le poids de stérides en

multipliant par 1,65 (moyenne des acides gras C/7) (1), le poids de cholestérol trouvé.

S'il existe une différence entre le poids des lipides totaux et la somme phosphatides + cholestérol, nous pouvons conclure que d'autres lipides sont entraînés avec les protéides dans leur précipitation. Nous avons en effet constaté qu'il existe une différence (que nous désignons par « inconnu ») ainsi que le montre le tableau 5.

TABLEAU 5

N° des tubes	pH	P lipidique (mg)	Phosphatides (mg)	Cholestérol (mg)	Stérides (mg)	Inconnu (mg)
6	5,08	0,159	4,14	1,71	2,82	3,8
7	4,36	0,347	9,01	5,90	9,73	1,4
8	4,09	0,370	3,60	6,80	11,22	1,0
9	3,80	0,380	3,90	6,86	11,24	1,7
10	3,38	0,354	9,20	6,06	10,0	2,1
11	3,01	0,908	10,60	6,73	11,1	1,3
12	2,56	0,432	11,20	6,95	11,4	1,0

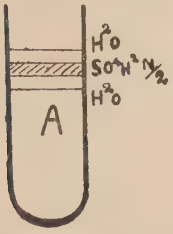
De plus, il faut remarquer que vers pH 5 une quantité appréciable de lipides inconnus, précipite, mais ceux-ci se redissolvent en majeure partie si l'on acidifie quelque peu le milieu. Par la suite, les traces d'inconnu présentes ne varient plus, aux erreurs d'expérience près.

Cet essai permet de conclure qu'il est fort probable qu'il existe dans les albumines du sérum une fraction protéidique présentant un minimum de solubilité aux environs de pH 3,8 mais, pour pouvoir conclure avec certitude de l'existence de cette fraction, il aurait fallu que la courbe n° 5 présentât un minimum de solubilité à ce pH. Or, comme nous l'avons signalé précédemment, il est fort probable que la forme de cette courbe est due à l'influence du temps de contact entre les divers réactifs; c'est pourquoi nous avons décidé d'effectuer une nouvelle série d'essais, dans laquelle nous réduirons l'influence du facteur temps.

(1) Ici, nous faisons un calcul qui nous donne pour les stérides un chiffre par excès, car une partie notable du cholestérol n'est pas estérifié. Cela ne fait que diminuer ce que nous appelons l'inconnu qui est calculé par différence.

3e SERIE D'ESSAIS

La solution d'albumine provenant de 150 cm3 de sérum a été préparée selon la technique décrite dans la précédente expérience. Elle mesure un volume de 320 cm3 (liquide A). Dans douze tubes à centrifuger préalablement tarés, on place 25 cm3 du liquide A, puis avec beaucoup de précaution 2 cm3 d'eau distillée, afin que cette dernière ne se mélange pas avec la solution albumineuse.



On ajoute ensuite l'acide sulfurique 2N avec grand soin, afin que l'eau distillée précédemment ajoutée empêche le contact direct entre l'acide et la solution protéidique. Nous avons d'ailleurs observé que la surface de cette dernière ne présentait pas le moindre trouble, ce qui prouve que pratiquement l'acide n'était pas au contact de la solution albuminique. Enfin nous avons, dans tous nos échantillons, ajouté des quantités variables d'eau distillée afin que le volume total soit le même partout.

En opérant ainsi, nous avons pu effectuer en même temps les différents mélanges et éliminer pratiquement l'influence du temps de contact entre la solution protéidique et l'acide.

Dix minutes exactement après le mélange, nos échantillons ont été soumis à la centrifugation. Les eaux mères ont été éliminées, tandis que les culots protéidiques ont été analysés.

Dans le tableau n° 6 se trouvent les résultats que nous avons obtenus dans cette expérience :

TABLEAU 6

N° des tubes	Millivolts (18°)	pH	Protéides (mg)	Lipides (mg)	Cholestérol (mg)	Rapport lipides protéides
1	681,2	7,48	179,6	8,7	2,31	0,048
2	633,1	6,65	216,7	8,0	2,17	0,037
3	572,2	5,60	449,1	15,9	4,34	0,035
4	506,4	4,44	572,2	30,5	8,40	0,053
5	502,2	4,38	614,2	33,0	8,65	0,053
6	486,6	4,11	661,7	36,3	8,70	0,054
7	465,1	3,72	667,3	37,5	9,70	0,056
8	436,4	3,22	641,1	34,9	8,39	0,054
9	427,9	3,09	556,3	32,3	8,00	0,058
10	424,1	3,04	684,1	31,5	7,72	0,046
11	411,1	2,80	717,0	33,6	8,93	0,046

Au tableau n° 5 correspondent les courbes des figures 9, 10 et 11.

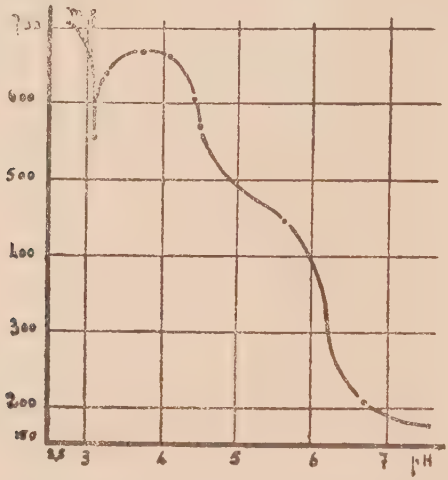


Fig. 9. — Courbe représentative des variations du poids de protéides précipités en fonction du pH.

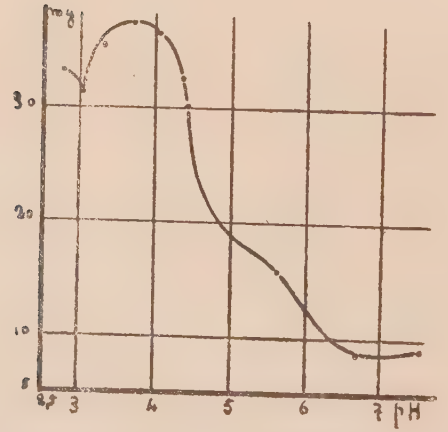


Fig. 10. — Courbe représentative des variations du poids de lipides précipités en foncton du pH.

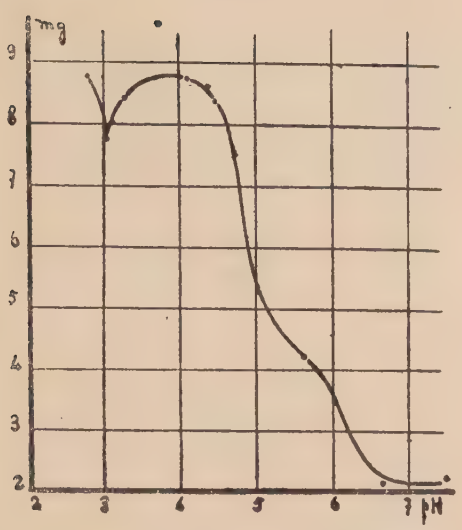


Fig. 11 — Courbe représentative des variations du poids de cholestérol précipité en fonction du pH.

Ces courbes présentent toutes le même aspect comparable d'ailleurs à celui observé dans l'expérience précédente.

En éliminant l'influence du temps de contact entre la solution protéidique et la solution acide, nous observons, cette fois, que la courbe de précipitation des protéides est tout à fait comparable à celles des lipides et du cholestérol.

A la suite de nos diverses expériences nous pouvons conclure avec certitude que les albumines du sérum sanguin contiennent une fraction protéidique présentant un minimum de solubilité aux environs de pH 3,8.

Il est intéressant de rapprocher ce résultat de celui obtenu jadis par Machebœuf (37) qui a montré que pour obtenir la précipitation quasi totale des protéides d'une solution d'albumines sériques, il suffit d'ajouter une quantité de sulfate d'ammonium légèrement supérieure à la demi-saturation et d'amener le pH aux environs de 3,8—3,9 (virage au bleu d'un papier au rouge congo).

Un examen détaillé de nos courbes montre l'existence d'un point d'inflexion situé entre pH 4 et 5. L'existence de ce point est encore confirmée par le fait que le rapport $\frac{\text{lipides}}{\text{protéides}}$ change brusquement de valeur lorsqu'il passe de pH 5,6 à 4,4 ainsi que le montre le tableau n° 6.

Ceci nous permet d'ailleurs de supposer que les courbes que nous obtenons ne sont autre chose que la résultante de deux courbes correspondant à deux fractions protéidiques ayant leur minimum de solubilité à des pH différents (voir plus loin, page 48).

Après avoir remarqué que cette expérience ne pouvait être menée à bien qu'à la condition d'éliminer l'influence du temps de contact entre la solution protéidique et l'acide, nous avons décidé d'étudier en détail l'influence de ce temps de contact.

INFLUENCE DU TEMPS DE CONTACT ENTRE LA SOLUTION PROTEIDIQUE ET L'ACIDE DANS LA PRECIPITATION DES ALBUMINES PAR LE SULFATE D'AMMONIUM EN FONCTION DU pH.

Au cours de nos expériences précédentes, nous avons eu l'occasion de remarquer, à plusieurs reprises, que les eaux mères, obtenues après centrifugation de la solution protéidique traitée par la solution acide, se troublaient après un certain temps et le trouble était particulièrement abondant pour les pH très acides.

Nous avons désiré préciser cette observation en effectuant un essai quantitatif.

Les eaux mères provenant de la centrifugation de l'échantillon n° 6 (pH 5,08) dans l'essai n° 2 ont été additionnées de quelques centimètres cubes d'acide sulfurique N/2 jusqu'à ce que le pH soit de 3,52.

Après vingt minutes de contact, un précipité est apparu (précipité A). Il a été recueilli par centrifugation tandis que les eaux mères étaient de nouveau mises de côté. Après deux heures d'attente, ces eaux mères s'étaient de nouveau troublées, elles furent soumises à la centrifugation et le précipité formé fut recueilli (précipité B).

Ces deux précipités A et B contenaient :

précipité A :	protéides	40,3 mg
	lipides	6,6
	cholestérol	2,0
précipité B :	protéides	7,8 mg
	lipides	0,7
	cholestérol	0,45

Ces résultats montrent tout d'abord que le temps de contact entre la solution albuminique, le sulfate d'ammonium et l'acide a une très grande importance.

Ils nous montrent, en outre, que la précipitation effectuée en un seul temps ne donne pas le même résultat que la précipitation effectuée en deux temps ; si nous nous reportons en effet aux courbes précédentes, nous constatons qu'à pH 3,52, 435 mg de protéides ont été précipités tandis que si la précipitation a été opérée en deux fois (323,2 + 40,3 + 7,8), 371,3 mg de protéides seulement ont été précipités.

Ces constatations nous ont incité à étudier systématiquement l'influence de ce temps de contact en effectuant une nouvelle expérience, afin de voir si le temps de contact était susceptible d'avoir une grande influence sur l'allure générale de nos courbes.

Comme dans les essais précédents, nous avons préparé une solution d'albumines sériques que nous avons répartie dans huit tubes à centrifuger à raison de 20 cm3 par tube.

Dans nos tous premiers essais, nous avions remarqué que l'influence du temps de contact était pratiquement négligeable pour les pH supérieurs à 3,5. C'est pourquoi nous nous sommes contenté d'étudier l'influence du temps de contact pour des pH inférieurs à cette valeur.

Pour cela nous avons étudié la précipitation des albumines par le sulfate d'ammonium en fonction du pH. Cinq de nos échantillons ont été additionnés de sulfate d'ammonium, de quantités variables d'acide sulfurique 2 N et d'eau distillée, comme dans les expériences précédentes. Les pH de ces échantillons étaient les suivants :

N° 1.....	4,29
N° 2.....	3,88
N° 3.....	3,42
N° 4.....	3,02
N° 5.....	2,73

Après agitation et après cinq minutes de contact, nous les avons centrifugés.

Les échantillons 3, 4 et 5 ont été effectués en double et la deuxième série a été soumise à la centrifugation beaucoup plus tard seulement, après une heure de contact.

Sur les précipités recueillis par centrifugation, nous avons effectué des dosages de protéides et de lipides. Le tableau N° 7 indique les résultats que nous avons obtenus.

TABLEAU 7

N°	Temps de contact	pH	Protéides (mg)	Lipides (mg)
1	5 minutes	4,23	41,2	6,0
2	»	3,88	293,4	18,9
3	»	3,42	293,3	21,5
4	»	3,02	325,4	18,6
5	»	2,73	327,0	20,6
6	1 heure	3,42	310,1	22,6
7	1 heure	3,02	300,3	22,9
8	1 heure	2,76	315,3	23,3

Au tableau N° 6 correspondent les courbes des figures 12 et 13.

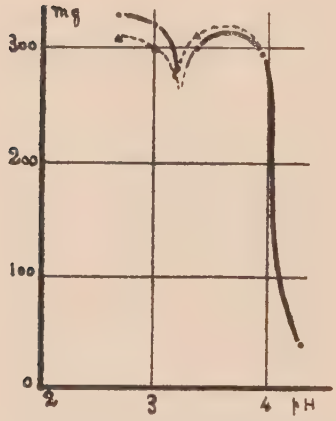


Fig. 12. — Courbes représentatives des variations du poids de protéides précipités en fonction du pH.
Après 5 min. de contact (●)
Après 1 h. de contact (▲)

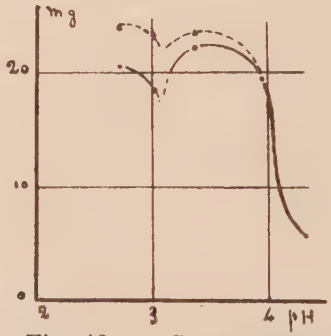


Fig. 13. — Courbes représentatives des variations du poids de lipides précipités en fonction du pH.
Après 5 min. de contact (●)
Après 1 h. de contact (▲)

Ces courbes montrent qu'à pH 3,42 la précipitation n'est pas complète après cinq minutes de contact entre la solution albumineuse et la solution acide et que le facteur temps est loin d'être négligeable, comme nous l'avions d'ailleurs prévu au début de nos essais. Ce fait est dû, pensons-nous, à la dénaturation progressive par le liquide salé acide de certaines fractions qui deviennent ainsi moins solubles et précipitent secondairement.

DETERMINATION DU POINT ISOIONIQUE DE CERTAINES FRACTIONS EXTRAITES DES ALBUMINES SERIQUES

Nous avons vu précédemment que si, à partir d'une solution d'albumines sériques, on trace les courbes représentatives des variations des poids de protéides, de lipides, de phosphore lipidique et de cholestérol précipités par le sulfate d'ammonium, en fonction du pH, on observe l'existence d'un maximum situé aux environs de pH 3,8.

Au premier abord, ce résultat pourrait paraître surprenant ; on aurait pu s'attendre, en effet, à voir de telles courbes présenter un maximum au voisinage de pH 5, car la sérum albumine cristallisée purifiée, présente un pH isoionique de 5,2.

Un examen détaillé de ces courbes montre que, plus on se rapproche de pH 3,8, plus les fractions précipitées sont riches en lipides.

A la lumière de cette constatation, nous avons pensé que les lipides fixés aux protéides modifiaient la solubilité de ces derniers et nous nous sommes demandé si le pH isoionique, qui, on le sait, est toujours très voisin du minimum de solubilité, ne variait pas avec les fractions considérées.

Pour répondre à cette question nous avons effectué l'essai suivant :

A partir de 80 cm3 de sérum de cheval nous avons préparé, suivant la technique précédemment exposée, une solution d'albumines mesurant un volume de 163 cm3. Cette solution a été additionnée de sulfate d'ammonium pulvérisé (1).

A cette solution nous avons ajouté goutte à goutte en agitant de l'acide sulfurique 2 N jusqu'au virage du bromo-crésol pourpre. Cette solution ainsi traitée mesurait un pH de 5,19. Le précipité recueilli par centrifugation a été dissous dans 20 cm3 d'eau très légèrement ammoniacale et porté à la dialyse sous pression contre de l'eau distillée fréquemment renouvelée.

Les eaux mères de centrifugation ont été traitées par une nouvelle quantité d'acide jusqu'à ce qu'apparaisse un nouveau précipité. A ce moment, le pH était de 3,58. Ce nouveau précipité recueilli par centrifugation et

(1) Des dosages nous ont montré qu'ainsi préparée, cette solution contenait 12,33 g. de protéides et 400 g. de sulfate d'ammonium par litre.

traité comme le précédent, a été mis également à la dialyse sous pression.

Les eaux mères obtenues au cours de cette opération ont été acidifiées ; le pH a été ainsi amené à 2,63. Dans ces conditions, un nouveau précipité est apparu et, après avoir été traité comme les deux précédents, il a été soumis à la dialyse.

Dans les trois cas, la dialyse a été poussée jusqu'à ce que le pH des solutions ne varie plus (isoionique).

Dans chaque échantillon, nous avons effectué un dosage de protéides et de lipides. Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le tableau N° 8.

TABLEAU 8

Précipités	pH	Protéides (g)	Lipides (g)	Lipides p. 100 des protéides	pH isoioniques
1	5,2	1,60	0,023	1,4	5,20 + 0,10
2	3,6	0,43	0,086	13	5,35 + 0,10
3	2,6	0,06	0,020	30	5,70 + 0,10

L'examen de ce tableau nous permet de faire les constatations suivantes :

Les protéides qui précipitent vers pH 5 sont des albumines à peu près sans lipides et leur point isoionique est identique à celui d'albumine purifiée et délipidée (5,2). Par contre, les précipités qui apparaissent ultérieurement lorsque l'on abaisse encore le pH sont très riches en lipides et ils ont un isoionique anormal légèrement supérieur à celui de la sérum albumine purifiée. Ces précipités sont très riches en cénapses lipidoprotéidiques et le fait d'être liés à des lipides confère aux albumines des propriétés particulières : isoélectrique anormal et précipitation anormale par acidification en présence de sulfate d'ammonium.

Notons d'ailleurs que leur propriété de précipiter seulement à des pH inférieurs à 5 n'est pas la conséquence d'isoioniques bas ; bien au contraire, leurs isoioniques sont légèrement supérieurs à ceux du précipité N° 1, qui avait été recueilli à pH 5,2.

A la suite de ces constatations et de l'étude des courbes obtenues précédemment (existence de légères inflexions) on peut émettre l'hypothèse suivante :

— les albumines du sérum sont constituées au moins par trois fractions distinctes :

1) des albumines libres présentant un isoionique normal (5,2) et précipitant en fonction du pH suivant une loi normale (optimum vers leur isoionique) ;

2) des cénapses lipidoprotéidiques d'au moins deux types différents dont les isoioniques sont légèrement supérieurs à 5,2 et dont la précipitation par acidification s'opère seulement à des pH inférieurs qui diffèrent suivant le type envisagé.

Afin de corroborer cette hypothèse, nous avons cherché à séparer et à étudier ces deux fractions protéidiques : Les résultats que nous avons obtenus sont exposés dans l'essai suivant.

FRACTIONNEMENT DES ALBUMINES SERIQUES

A partir de 115 cm3 de sérum, nous avons préparé 275 cm3 de solution albumineuse en utilisant la technique précédemment décrite. Cette solution a été amenée à pH 5,6 à l'aide d'acide sulfurique 2N. Un précipité est apparu, nous l'avons recueilli par centrifugation. Les eaux mères ont été mises de côté (solution B). Le précipité obtenu a été dissous dans quelques centimètres cubes d'eau très légèrement ammoniacale (solution A). Cette solution (A) a été additionnée d'un égal volume de solution saturée de sulfate d'ammonium. L'ensemble mesurait à ce moment 180 cm3. Nous avons ajouté à cette solution 19 g. de sulfate d'ammonium finement pulvérisé et nous avons complété à 275 cm3 à l'aide d'une solution demi-saturée en sulfate d'ammonium.

La solution ainsi obtenue mesurait donc le même volume que la solution albumineuse-mère dont nous étions parti, et sa concentration en sulfate d'ammonium, légèrement supérieure à la demi-saturation, nous a placé dans les mêmes conditions expérimentales que dans les essais précédents.

Cette solution a été répartie dans 10 tubes à centrifuger tarés (à raison de 25 cm3 par tubes). Le contenu de chaque tube a été amené à un pH différent par addition de quantités variables d'acide sulfurique 2N. Enfin, chaque échantillon a été complété à un même volume (27 cm3).

Pour effectuer les mélanges, nous avons adopté le mode opératoire décrit dans l'essai N° 3 et, après dix minutes de contact, nous avons soumis l'ensemble à la centrifugation.

Dans les eaux mères obtenues nous avons effectué des mesures électrométriques de pH.

Dans les culots de centrifugation nous avons dosé comme précédemment les protéides et les lipides. Les résultats que nous avons obtenus sont rassemblés dans le tableau N° 9.

TABLEAU 9

Tubes	Millivolts	pH	Protéides (mg)	Lipides (mg)
1	696,1	7,70	84,5	2,5
2	687,8	7,57	81,5	2,6
3	661,1	7,20	85,7	2,6
4	604,2	6,14	87,7	2,6
5	561,2	5,40	114,7	3,9
6	671,9	4,68	138,7	5,8
7	504,9	4,42	145,2	6,4
8	496,9	4,28	145,8	6,9
9	446,1	3,40	151,3	6,0
10	424,2	3,10	151,3	6,7

La solution B (volume 250 cm3) a été traitée d'une façon identique. Huit tubes à centrifuger tarés ont reçu chacun 25 cm3 de cette solution. A chacun des échantillons nous avons ajouté des quantités variables d'acide sulfurique 2N et complété partout à un même volume (27 cm3). Après dix minutes de contact, nous avons soumis l'ensemble à la centrifugation. Les eaux mères ont servi à la détermination des pH, tandis que sur les culots de centrifugation ont été effectués les dosages de lipides et de protéides. Nos résultats sont consignés dans le tableau N° 10.

TABLEAU 10

N° des tubes	Millivolts à 17°	pH	Protéides (mg)	Lipides (mg)
1	573,9	5,60	traces	traces
2	513,1	4,55	29,4	5,3
3	500,1	4,34	91,7	10,0
4	470,4	3,22	100,3	11,0
5	453,1	3,50	102,1	11,7
6	438,3	3,23	95,1	11,4
7	409,8	2,73	96,5	11,6
8	487,8	2,36	106,5	11,6

Aux tableaux N° 9 et 10 correspondent les courbes des figures N° 14 et 15 :

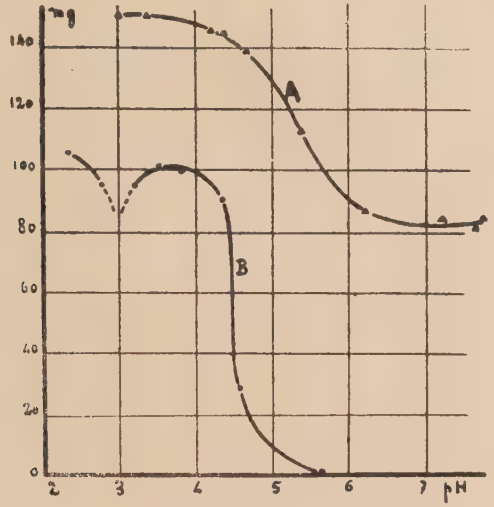


Fig. 14. — Courbe représentative des variations du poids de protéides précipités (dans les fractions A et B) par le sulfate d'ammonium en fonction du pH.

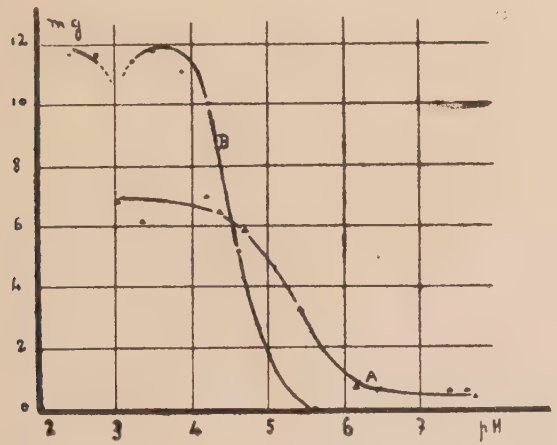


Fig. 15. — Courbe représentative des variations du poids de lipides précipités (dans les fractions A et B) par le sulfate d'ammonium en fonction du pH.

De l'examen des courbes, il ressort qu'il existe bien, comme le laissaient prévoir les essais précédents, une

fraction protéidique abondante présentant un minimum de solubilité aux environs de pH 3,8. De plus, la superposition des deux courbes (correspondant aux fractions A et B) nous permet d'expliquer le léger point d'inflexion que dans nos courbes précédentes, nous avions obtenu au voisinage de pH 5.

Les deux fractions que nous avons séparées dans cette expérience, sont-elles bien différentes ? Répondent-elles à des compositions différentes ? Le pourcentage des lipides contenus dans ces fractions nous permet de répondre affirmativement à cette question, ainsi que le montrent les résultats suivants (Tableau 11).

TABLEAU 11

	Précipités	pH	Lipides p. 100 des protéides
FRACTION A. —	1	7,70	2,9
	2	7,57	3,1
	3	7,20	3,0
	4	6,14	2,9
	5	5,40	3,4
	6	4,68	4,1
	7	4,42	4,4
	8	4,28	4,7
	9	3,40	3,9
	10	3,00	4,4
FRACTION B. —	1	5,60	4
	2	4,55	18
	3	4,34	10,9
	4	3,82	10,9
	5	3,50	11,4
	6	3,23	11,9
	7	2,73	12,0
	8	2,36	10,8

Les deux fractions A et B sont donc bien différentes ; elles contiennent en effet des quantités de lipides très différentes (3 à 4 p. 100 dans la fraction A — 10 à 11 p. 100 dans la fraction B).

Les résultats de cet essai corroborent ceux que nous avions obtenus précédemment et nous permettent de conclure que dans les albumines du sérum sanguin, il existe au moins trois grandes fractions protéidiques :

la première constituée par des albumines à peu près pures et ayant un point isoionique de 5,2 ;

la seconde constituée par des cénapses lipidoprotéi-

ques assez pauves en lipides, semble être celle qui a été particulièrement bien étudiée par Sandor, Perez et Bonnefoi (74) ;

la troisième constituée par des cénapses lipidoprotéidiques particulièrement riches en lipides et contenant les cénapses acidoprécipitables, dont Machebœuf (37) a montré jadis l'existence. Cette fraction présente un minimum de solubilité au niveau de pH 3,8.

CONCLUSIONS

Au cours de ce travail, nous avons étudié la précipitation des albumines du sérum sanguin par le sulfate d'ammonium en fonction du pH, en examinant tout particulièrement le sort des substances lipoïdiques qui accompagnent les protéides dans leur précipitation.

L'existence de maxima et de points d'inflexion dans nos courbes de précipitation nous a amené à effectuer une précipitation fractionnée des albumines du sérum et à étudier le point isoionique et la solubilité des fractions obtenues.

Nos résultats nous permettent d'émettre les conclusions suivantes :

— Les albumines du sérum sont constituées au moins par trois fractions distinctes :

1° des albumines libres présentant un isoionique normal (5,2) et précipitant en fonction du pH suivant une loi représentée par une courbe présentant une inflexion très nette au point correspondant à l'isoélectrique;

2° des cénapses lipidoprotéidiques de deux types différents dont les isoioniques sont nettement supérieurs à 5,2 et dont la précipitation par acidification s'opère seulement à des pH inférieurs.

La précipitation des phosphatides débute plus précocément que celle du cholestérol. Il faut donc admettre que la totalité du cholestérol et de la lécithine n'est pas engagée dans une seule et même cénapse. Il y a donc bien plusieurs fractions dans les albumines du sérum. Cette constatation corrobore nos précédentes conclusions.

Etant données les variations que subit la teneur en albumines du sérum sanguin au cours de certaines maladies (œdemes, cirrhoses, néphroses, etc.), étant donné de plus, le rôle primordial joué par cette fraction

protéidique dans les équilibres des membranes, nous avons espéré qu'à la lumière des quelques résultats que nous apportons, il sera peut-être possible de mieux expliquer certaines des propriétés des albumines qui restent encore bien obscures.

Vu : *Le Doyen,*
P. MAURIAC.

Vu bon à imprimer.
Le Président,
MACHEBŒUF.

Vu et permis d'imprimer.

Bordeaux, le 20 Avril 1943.

L'Inspecteur général de l'Enseignement supérieur,
Recteur de l'Académie,
A. LIRONDELLE.

BIBLIOGRAPHIE

1. — Abderhalden. — Zeitsch. f. Phys. Chem. (1902), t. 37, p. 495.
2. — Abderhalden *et* Komm. — Ueber die Anhydridstruktur des Proteins, Ibid. (1924), p. 139-181.
3. — Achart et Grigaut. — Cité d'après Lematte. — Revue de Médecine. Fév. 1933.
4. — Bang. — Ergebnisse der Physiol. (1907-1909), t. 6, p. 131 et t. 8, p. 463.
5. — Battut. — Tèse doctorat d'Université (Pharmacie). Bordeaux 1939.
6. — Chick. — Biochem. Journ. (1914), t. 8, p. 414.
7. — Degkwitz. — Ergebnisse der Physiol. (1931), t. 32, p. 821.
8. — Delage. — Thèse doctorat ès-Sciences. Paris. 1939.
9. — Dizerbo. — Thèse doctorat d'Université (Pharmacie) Bordeaux. 1939.
10. — Doerr et Berger. — Biochem. Zeitschr. (1902), t. 131, p. 13.
11. — Dulieres. — C.R. Soc. Biol. (1937), t. 126, p. 923.
12. — Faure. — Thèse doctorat ès-Sciences. Paris. 1940.
13. — Fleitmann. — Ann. Chem. u. Pharm. ( ), t. 66, p. 381.
14. — Freund et Joachim. — Zeitschr. f. Physiol. Chem. (1902), t. 36, p. 407.
15. — Freund et Lustig. — Biochem. Zeitschr., (1926), t. 167, p. 355.
16. — Fuld et Spiro. — Zeitschr. f. Physiol. Chemie. (1909), t. 31, p. 132.
17. — Furt et Fischer — Biochem. Zeitschr. (1924), t. 154, p. 123.
18. — Gardner et Gainsborough. — Biochem. Journ. (1927), t. 11, p. 141.
19. — Guerber. — Sitzungsbericht. d. Wuezburger med. ges. (1894).
20. — Haas et Trautmann. — Zeitschr. Phys. Chem., (1923), t. 127, p. 52.
21. — Halliburton. — Journ. of. Physiol., (1886), t. 7, p. 319.
22. — Hammarsten. — Ergebnisse der Physiol., (1902), t. 1, p. 330.
23. — Handowsky et Wagner. — Biochem. Zeitschr., (1911), t. 31, p. 33.
24. — Hardy. — Journ. Physiol. (1905), t. 33, p. 251.
25. — Herzfeld. — Biochem. Zeitschr., (1913), t. 56, p. 258.

26. — HOFMEISTER. — Zeitschr. f. Physiol. Chemie, (1884), t. 14, p. 165.

27. — HOFMEISTER. — Zeitschr. f. Physiol. Chemie, (1891), t. 16, p. 187.

28. — HOPPE-SEYLER. — Medezinisch Chemische Untersunch a. D. Labor. f. angew. chem., Tubingen. (1867 à 1871), t. 2, p. 215 ; t. 3, p. 391 et t. 4, p. 486.

29. — HOUGARDY. — Chem. Zentr., (1900), t. 2, p. 282.

30. — HOWE. — Journ. of. Biol. Chem., (1921), t. 49, p. 93.

31. — JAMESON et ROBERTS. — J. gen. Physiol. (1937), t. 20, p. 475.

32. — JARISCH. — Pflugers Arch. f. d. ges. Physiol. (1921), t. 186, p. 299 et (1922), t. 194, p. 337.

33. — KAUDER. — Arch. f. exp. Path. u. Phar., (1886), t. 20, p. 411.

34. — KIJOTARI. — Bioch. Zeitschr. (1923), t. 134, p. 322.

35. — KUMAGAWA et SUTO. — Bioch. Zeitschr., (1908), t. 8, p. 213, 250, 340 et 347.

36. — LIEBERMANN. — Pflugers Arch., (1891), t. 50, p. 55 et (1893), t. 54, p. 573.

37. — MACHEBŒUF. — Thèse doctorat ès-Sciences. Paris. 1928.

38. — MACHEBŒUF. — Bull. Soc. Chim. Biol. (1929), t. 11, p. 268 et 485.

39. — MACHEBŒUF. — Bull. Soc. Chim. Biol., (1926), t. 7, p. 464.

40. — MACHEBŒUF. — Etat des lipides dans la matière vivante. Les cénapses et leur importance biologique. 1 vol. Paris 1937. Hermann édit.

41. — MACHEBŒUF et DELSAL. — Bull. Soc. Chim. Biol., (1942), t. 24, p. 296.

42. — MACHEBŒUF et DIZERBO. — C. R. Soc. Biol. (1939), t. 130. p. 481.

43. — MACHEBŒUF et DUBOY. — C. R. Soc. Biol., (1939), t. 132, p. 272.

44. — MACHEBŒUF et JANUSKIEWICZ. — Bull. Soc. Chim. Bio., (1937), t. 19, p. 694.

45. — MACHEBŒUF et SANDOR. — Bull. Soc. Chi. Bio., (1932), t. 14, p. 1168.

46. — MACHEBŒUF et TAYEAU. — C. R. Ac. Sc., (1938), t. 206, p. 860.

47. — MACHEBŒUF et TAYEAU. — C. R. Soc. Biol., (1938), t. 129, p. 1181.

48. — MACHEBŒUF et TAYEAU. — C. R. Soc. Biol., (1938), t. 129, p. 1184.

49. — MACHEBŒUF et TAYEAU. — Bull. Soc. Chim. Biol., (1941), t. 23, p. 31.

50. — MACHEBŒUF et TAYEAU. — Bull. Soc. Chim. Biol., (1941), t. 23, p. 49.

51. — MACHEBŒUF et TAYEAU. — C. R. Soc. Biol., (1939), t. 130, p. 478.

52. — MACHEBŒUF et TAYEAU. — Bull. Soc. Chim. Biol. (1941), t. 23, p. 196.

53. — MACHEBŒUF, TAYEAU et BATTUT. — C. R. Soc. Biol. (1939), t. 130, p. 81.

54. — MACHEBŒUF et VANAUD. — C. R. Soc. Biol. (1941), t. 135, p. 1249.

55. — MALERBA. — Acad. de Scienze Fisiche er Med. d'Napoli. Fasc. 3,5. (1894).

56. — MARCUS EMIL. — Zeitschr. f. Physiol. Chemie, (1899), t. 28, p. 559.

57. — METZGER. — Thèse Médecine. Strasbourg. 1932.

58. — MICHAELIS et RONA. — Bioch. Zeitschr. (1910), t. 27, p. 38 et (1910) t. 28, p. 193.

59. — MOERNER. — Zeitschr. Phys. Chem. (1902), t. 34, p. 207.

60. — OKABE. — Journ. of. Bioch., (1928), t. 8, p. 459.

61. — OPPENHEIMER. — Verh. d. Berl. Physiol. ges., (1902).

62. — PANUM. — Wirchow. Archiv., (1851), t. 3, p. 419.

63. PIETTRE. — C. R. Ac. Sc., (1928), t. 186, p. 1657 et t. 192, p. 894.

64. — PEREZ. — Thèse doctorat ès-Sciences. Paris. 1939.

65. — POHL. — Archiv. f. exp. Path. u. Pharm. (1886), t. 20, p. 246.

66. — POLONOVSKI et LESPAGNOL. — Chimie organique biologique. 2e édition. 1 vol., Masson édit. Paris. 1942.

67. — PORGES et SPIRO. — Beitr. z. Chem. Physiol. u. Path., (1903), t. 3, p. 277.

68. — QUINAN. — Beitr. z. Chem. Physiol. u. Patho., (1904), t. 5, p. 95.

69. — REBOUL. — Thèse Doctorat en médecine. Bordeaux. 1941.

70. — ROBERTSON. — Journ. of. Biol. Chem., (1913), t. 13, p. 325.

71. — SAMUELY. — Oppenheimer Hand. d. Biochemie, (1904), t. 1, p. 286.

72. — SANDOR. — Thèse doctorat ès-Sciences. Paris. 1934.

73. — SANDOR. — Bull. Soc. Chim. Biol., (1936), t. 18, p. 877.

74. — SANDOR, BONNEFOI et PEREZ. — C. R. Ac. Sc., (1933), t. 197, p. 1254.

75. — SANDOR, BONNEFOI et GORET. — Bull. Soc. Chim. Biol., (1933), t. 15, p. 1472.

76. — SCHMIDT. — Reichters u. du Bois-Raymond Archiv. (1862)

77. — SCHULTZ. — Zeitschr. Phys. Chem. (1902), t. 34, p. 207.

78. — SOERENSEN. — C. R. Lab. Carlsberg., 1915-17, vol. 12.

79. — SOERENSEN. — C. R. Lab. Carlsberg., 1927, vol. 19, p. 11.

80. — SVEDBERG. — Kolloidzeitschr. 36 b. (Zsigmardy Festschrift), (1925), t. 53.

81. — SVEDBERG. — Journ. Amer. Chem. Soc., (1926), t. 48.

82. — TAYEAU. — Thèse doctorat ès-Sciences. Bordeaux. 1939.

83. — Tayeau. — C. R. Soc. Biol. (1939), t. 130, p. 1027.
84 — Tayeau. — C. R. Soc. Biol. (1939), t. 130, p. 1029.
85. — Tayeau. — C. R. Ac. Sc. (1941), t. 212, p. 575.
86. — Tayeau. — C. R. Soc. Biol. (1943) sous presse (Séance de février).
87. — Tayeau. — C. R., Soc. Biol. (1943), sous presse (Séance de mars).
87 bis. — Tayeau et Martin. — C. R. Soc. Biol. (1943), sous presse (Séance d'avril).
88. — Thiodet et Ribere. — Bull. Soc. Chim. Biol. (1938), t. 20, p. 495.
89. — Tiselius. — Bioch. Journ. (1937), t. 31, p. 313.
90. — Vanaud. — Thèse doctorat d'Université (Pharmacie). Bordeaux. 1942.
91. — Weyl. — Zeischr. f. Physiol. Chemie (1877), t. 1, p. 72.
92. — Willstaetter et Rohdewald. — Zeitschr. f. Physiol. Chem. (1934), t. 225, p. 103.

TABLE DES MATIERES

PAGES

Introduction 5

Première partie. — HISTORIQUE

Les Protéides du sérum sanguin 9
Comparaison entre les globulines et les albumines..... 10
Les cénapses lipidoprotéidiques 11
Fractionnement des globulines 12
Fractionnement des albumines 13

Deuxième partie. — TECHNIQUES UTILISÉES

Obtention des albumines sériques 19
Dosage des protéides et des lipides 20
Dosage du phosphore lipidique 21
Dosage du cholestérol 22
Préparation des dialyseurs 23
Détermination des points isoioniques 24
Mesure des pH et courbes de titration..... 24

Troisième partie. — RECHERCHES EXPERIMENTALES

Précipitation des albumines par S04 (NH4) 2 en fonction du pH 29
Essais n° 1 29
Essais n° 2 32
Essais n° 3 37
Influence du temps de contact 40
Point isoionique des différentes fractions 43
Fractionnement des albumines sériques 45
CONCLUSIONS 51
Bibliographie 53
Table des Matières 57